

Für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierende Nukleotidsequenzen, Verfahren zu deren Isolierung und ihre Verwendung

Gegenstand der Erfindung sind für den Export verzweigtket-
5 tiger Aminosäuren kodierende Nukleotidsequenzen, Verfahren zu deren Auffinden und Isolieren und Verfahren zur fermentativen Herstellung von verzweigtkettigen Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen Gene, die für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodieren, ver-
10 stärkt werden.

Stand der Technik

Die verzweigtkettigen Aminosäuren L-Isoleucin, L-Valin, und L-Leucin finden in der pharmazeutischen Industrie, der Humanmedizin, und in der Tierernährung Anwendung.

15 Es ist bekannt, daß verzweigtkettige Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum hergestellt werden können. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können
20 fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.
25

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das
30 Isoleucin-Analogon Isoleucinhydroxamat (Kisumi M, Ko-

matsubara S, Sugiura, M, Chibata I (1972) Journal of Bacteriology 110: 761-763), das Valin-Analogon 2-Thiazolealanine (Tsuchida T, Yoshinanga F, Kubota K, Momose H (1975) Agricultural and Biological Chemistry, Japan 39: 1319-1322),

5 oder das Leucin-Analogon α -Aminobutyrate (Ambe-Ono Y, Sato K, Totsuka K, Yoshihara Y, Nakamori S (1996) Bioscience Biotechnology Biochemistry 60: 1386-1387) sind, oder die auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und verzweigtkettige Aminosäuren produzieren (Tsuchida T, Yos-10 hinaga F, Kubota K, Momose H, Okumura S (1975) Agricultural and Biological Chemistry; Nakayama K, Kitada S, Kinoshita S (1961) Journal of General and Applied Microbiology, Japan 7: 52-69; Nakayama K, Kitada S, Sato Z, Kinoshita (191) Journal General and Applied Microbiology, Japan 7: 41-51).

15 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung verzweigtkettige Aminosäuren produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne verzweigtkettige Aminosäuren-Biosynthese gene amplifiziert, und die Auswirkung auf die 20 verzweigtkettige Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria", in: Biology of Industrial Micro-organisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)), Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)), und Eggeling et al., Journal of Biotechnology 56: 168-180 (1997)).

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von verzweigtkettigen Aminosäuren bereitzustellen.

5 Beschreibung der Erfindung

Verzweigtkettige Aminosäuren finden in der pharmazeutischen Industrie, in der Humanmedizin, und in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von verzweigtkettigen Aminosäuren bereitzustellen.

Wenn im folgenden verzweigtkettige Aminosäuren erwähnt werden sind damit insbesondere L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide, 15 enthaltend mindestens eine der Polynukleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das mindestens eine Aminosäuresequenz SEQ ID No. 3 oder 20 5 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit einer Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5,
- 25 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenso eine in coryneformen
5 Mikroorganismen replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der Herkunft Corynebacterium, die zumindest die Nukleotidsequenzen enthält, die für die Gene brnF und/oder brnE, dargestellt in der SEQ ID No. 1 und in der SEQ ID No. 6, kodieren.

10 Gegenstand ist ebenfalls eine replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No. 1 oder SEQ-ID-No. 6, die für die Gene brnE und/oder brnF codieren, oder

15 (ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i), oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

20 (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

Polynukleotide gemäß Anspruch 2, enthalten mindestens eine der Nukleotidsequenzen, ausgewählt aus den SEQ ID No. 1, 2, 4 oder 6, dargestellten

Polypeptide gemäß Anspruch 2, die für Polypeptide codieren, die mindestens eine der Aminosäuresequenzen, wie in SEQ ID No. 3 oder 5 dargestellt, enthalten

ein Vektor, enthaltend das oder die Polynukleotide gemäß Anspruch 1, oder die in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 6 dargestellte DNA-Sequenz.

und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den
5 Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die die vollständigen Gene mit
10 den Polynukleotidsequenzen entsprechend SEQ ID No. 1, 2, 4 oder 6 enthalten, mit einer Sonde, die die Sequenzen der genannten Polynukleotide gemäß SEQ ID No 1, 2, 4 oder 6 oder ein Fragment davon enthalten und Isolierung der genannten DNA-Sequenzen.

15 Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet, als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Isoleucin-, Leucin- oder Valin-Exportproteine codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit
20 der des brnF- und/oder brnE-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Isoleucin-, Leucin- oder Valin-Exportproteine codieren.
25

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge
30 von mindestens 40 oder 50 Basenpaaren.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um 5 nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

10 Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen die Polypeptide gemäß SEQ ID No. 3 und/oder 5, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Transports verzweigtkettiger Aminosäuren und auch solche ein, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit den Polypeptiden gemäß SEQ ID No. 3 15 und/oder 5, bevorzugt zu wenigstens 80 % und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit den Polypeptiden gemäß SEQ ID No. 3 und/oder 5 und die genannte Aktivität aufweisen.

Ebenso sind coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der 20 Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung der genannten replizierbaren DNA Gegenstand der Erfindung.

Die Erfindung betrifft weiter ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von verzweigtkettigen Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits 25 die verzweigtkettigen Aminosäuren produzieren und in denen die Nukleotidsequenzen der für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierenden Gene *brnE* und/oder *brnF* verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang 30 die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch

die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können verzweigtkettige Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.

10 Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

15 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind beispielsweise die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Brevibacterium flavum ATCC14067

20 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte verzweigtkettige Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme,

wie beispielsweise die Isoleucin produzierenden Stämme

25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14309
Corynebacterium glutamicum ATCC 14310
Corynebacterium glutamicum ATCC 14311
Corynebacterium glutamicum ATCC 15168
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871,

wie beispielsweise die Leucin produzierenden Stämme
Corynebacterium glutamicum ATCC 21885
Brevibacterium flavum ATCC 21889

oder wie beispielsweise die Valin produzierenden Stämme

5 Corynebacterium glutamicum DSM 12455
Corynebacterium glutamicum FERM-P 9325
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 9324
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 1763.

Den Erfindern gelang es die neuen Gene *brnE* und *brnF* von
10 *Corynebacterium glutamicum* zu isolieren. Zur Isolierung der
Gene wird zunächst eine im *brnF*- oder *brnE*-Gen defekte
Mutante von *C. glutamicum* hergestellt. Hierzu wird ein ge-
eigneter Ausgangsstamm wie z. B. ATCC14752 oder ATCC13032
einem Mutagenese-Verfahren unterworfen.

15 Klassische Mutagenese-Verfahren sind die Behandlung mit
Chemikalien wie z. B. N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin
oder UV-Bestrahlung. Derartige Verfahren zur Mutationsaus-
lösung sind allgemein bekannt und können unter anderem bei
Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory
20 Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacte-
ria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im
Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der
American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,
1981) nachgelesen werden.

25 Ein anderes Mutagenese-Verfahren ist die Methode der Trans-
posonmutagenese bei der die Eigenschaft eines Transposons
ausgenutzt wird in DNA-Sequenzen zu "springen" und dadurch
die Funktion des betreffenden Gens zu stören bzw. auszu-
schalten. Transposons coryneformer Bakterien sind in der
30 Fachwelt bekannt. So wurden aus *Corynebacterium xerosis*
Stamm M82B das Erythromycinresistenz-Transposon Tn5432

(Tauch et al., Plasmid (1995) 33: 168-179) und das Chloramphenicolresistenz-Transposon Tn5546 isoliert. Tauch et al. (Plasmid (1995) 34: 119-131 und Plasmid (1998) 40: 126-139) zeigten, daß eine Mutagenese mit diesen Transposonen möglich ist.

Ein anderes Transposon ist das Transposon Tn5531 das bei Ankri et al. (Journal of Bacteriology (1996) 178: 4412-4419) beschrieben wird und beispielhaft im Laufe der vorliegenden Erfindung eingesetzt wurde. Das Transposon Tn5531 enthält das aph3 Kanamycinresistenzgen und kann in Form des Plasmidvektors pCGL0040 verabreicht werden, der in Figur 1 dargestellt ist. Die Nukleotidsequenz des Transposons Tn5531 ist unter der Zugangsnummer (accession number) U53587 bei dem National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) frei verfügbar.

Nach erfolgter Mutagenese vorzugsweise Transposon-Mutagenese wird eine im brnF- oder brnE-Gen defekte Mutante gesucht. Eine im brnF- oder brnE-Gen defekte Mutante wird daran erkannt, daß sie auf Minimalagar gutes Wachstum aber auf Minimalagar, der mit verzweigtkettigen Aminosäure-haltigen Oligopeptiden wie z. B. dem Dipeptid Isoleucyl-isoleucin supplementiert wurde, schlechtes Wachstum zeigt.

Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Stamm ATCC14752brnE::Tn5531.

Ein auf die beschriebene Weise herstellter Stamm kann dann für die Klonierung und Sequenzierung des brnF- und/oder brnE-Gens verwendet werden.

Hierzu kann eine Genbank des interessierenden Bakteriums angelegt werden. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben.

Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Für die vorliegende Erfindung eignen sich solche Vektoren, die in coryneformen Bakterien vorzugsweise *Corynebacterium glutamicum* replizieren. Derartige Vektoren sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiel sei der Plasmidvektor pZ1 genannt, der bei Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology 20 (1989) 64: 549-554) beschrieben ist. Die auf die beschriebene Weise erhaltene Genbank wird anschließend mittels Transformation oder Elektroporation in den im brnF- oder brnE-Gen defekten Indikatorstamm überführt und solche Transformanten gesucht, die die Fähigkeit besitzen in Gegenwart verzweigtkettiger Aminosäure-haltiger Oligopeptide auf Minimalagar zu wachsen. Das klonierte DNA-Fragment kann anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

Bei Verwendung einer durch Tn5531-Mutagenese erzeugten Mutante eines coryneformen Bakteriums wie z. B. dem Stamm ATCC14752brnE::Tn5531 kann das brnE::Tn5531-Allel direkt unter Ausnutzung des in ihm enthaltenen Kanamycinresistenzgens aph3 kloniert und isoliert werden. Hierzu verwendet

man bekannte Kloniervektoren wie z. B. pUC18 (Norlander et al., Gene (1983) 26: 101-106 und Yanisch-Perron et al., Gene (1985) 33: 103-119). Als Klonierwirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die Selektion auf Transformanten erfolgt in Gegenwart von Kanamycin. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten wird anschließend sequenziert. Hierzu kann die von Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467) beschriebene Dideoxy-Kettenabbruchmethode verwendet werden. Hiernach erhält man die stromaufwärts und stromabwärts des Tn5531-Insertionsortes enthaltenen Gene. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen werden dann mit kommerziell erhältlichen Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem Programmpaket Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) oder dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Heidelberg, Deutschland) analysiert und zusammengefügt.

Auf diese Weise wurden die neuen für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren kodierenden DNA-Sequenzen von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1, Bestandteil der vorliegenden Erfindung sind. In SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 sind die Kodierregionen des brnF- und brnE-Gens dargestellt. In SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 5 sind die Aminosäuresequenzen der sich aus SEQ ID NO 1, bzw. SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 ergebenden Genprodukte dargestellt.

30 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind

ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1, oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Unter Ausnutzung der in SEQ-ID-No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz können geeignete Primer synthetisiert und diese dann dazu verwendet werden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) brnF-, und brnE-Gene verschiedener coryneformer Bakterien und Stämme zu amplifizieren. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994). Alternativ kann die in SEQ-ID-No. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder Teile davon als Sonde zur Suche von brnF- und/oder brnE-Genen in Genbanken von

insbesondere coryneformen Bakterien verwendet werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Firma Roche Diagnostics

5 (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die auf diese Weise amplifizierten brnE-, und brnF-Gene enthaltenden DNA-Fragmente werden anschließend kloniert und sequenziert.

10 Auf diese Weise wurde die in SEQ-ID-No. 6 dargestellte DNA-Sequenz der Gene brnF und brnE des Stammes ATCC13032 erhalten, die ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist.

15 Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des brnF- und/oder brnE Export-Gens in verbesselter Weise verzweigtkettige Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden.

20 Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen Herstellung verzweigtkettiger Aminosäuren zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in

25 Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ

30

kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei

5 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guer-
rero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga
(Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al.
(Gene 102, 93-98 (1991)), in der EP-B 0 472 869, im US Pa-
tent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9,
10 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environ-
mental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al.
(Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Pa-
tentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134,
15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-
15 A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bio-
engineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiolo-
gical Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbü-
chern der Genetik und Molekularbiologie.

Beispielhaft wurden die erfindungsgemäßen Gene brnF und
20 brnE mit Hilfe von Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide
eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repli-
ziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B.
pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology
(1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-
25 98 (1991)) oder pHSG2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74
(1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1
oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf
pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al.,
FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1
30 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwen-
det werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von verzweigtkettigen Aminosäuren vorteilhaft sein, neben den neuen *brnF*- und *brnE*-Genen ein oder mehrere für weitere Enzyme des bekannten Biosyntheseweges der verzweigtkettigen Aminosäuren oder 5 Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme des Zitronensäure-Zyklus kodierende Gene zu überexprimieren.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Isoleucin

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende *hom*-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 10 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende *hom*^{dr}-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)) oder
- gleichzeitig das für die Threonin-Dehydratase kodierende *ilvA*-Gen (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 15 8065-8072) oder das für eine "feed back resistente" Threonin- Dehydratase kodierende *ilvA*(Fbr)-Allel (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842), oder
- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene *ilvBN* (Keilhauer et al., (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), oder 20
- gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende *ilvD*-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder
- gleichzeitig das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende *pyc*-Gen (DE-A-19 831 609), oder 25
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende *mgo*-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

überexprimiert werden.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Leucin,

- gleichzeitig das für die Isopropylmalatsynthase kodierende leuA-Gen (Pátek et al., Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140) oder ein für eine "feed back resistente" Isopropylmalatsynthase kodierendes Allel, oder
- gleichzeitig die für die Isopropylmalatdehydratase kodierenden leuC- und leuD-Gene (Pátek et al., Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140), oder
- gleichzeitig das für die Isopropylmalatdehydrogenase kodierenden leuB-Gen (Pátek et al., Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140), oder
- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene ilvBN (Keilhauer et al., (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), oder
- gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende ilvD-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mgo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

überexprimiert werden.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Valin

- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene *ilvBN* (Keilhauer et al., (1993) *Journal of Bacteriology* 175: 5595-5603), oder
- gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende *ilvD*-Gen (Sahm und Eggeling (1999) *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1973-1979), oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende *mqa*-Gen (Molenaar et al., *European Journal of Biochemistry* 254, 395 - 403 (1998))

10 überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von verzweigtkettigen Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *brnE*- und/oder *brnF*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion verzweigtkettiger Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozess-technik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) erhalten.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der 5 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, 10 Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige 15 Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle 20 können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Ei- 25 sensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur 30 in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an verzweigtkettigen Aminosäuren gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse der verzweigtkettigen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikrorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm GM2929pCGL0040
als DSM 12839

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie
5 alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische
Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular
cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour
Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von
10 *Escherichia coli* wurde, wenn nicht anders beschrieben, nach
Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences
of the United States of America (1989) 86: 2172-2175)
durchgeführt.

Beispiel 1

Klonierung und Sequenzierung des *brnF*- und *brnE*-Gens von
15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

1. Transposonmutagenese

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 wurde einer
Mutagenese mit dem Transposon Tn5531 unterworfen, dessen
Sequenz unter der Accession-Nummer U53587 in der Nukleotid-
20 Datenbank des National Center for Biotechnology Information
(Bethesda, USA) hinterlegt ist. Aus dem Methylase-defekten
E. coli-Stamm GM2929pCGL0040 (*E. coli* GM2929: Palmer et
al., Gene (1994) 143: 1-12) wurde das Plasmid pCGL0040 iso-
liert, welches das zusammengesetzte Transposon Tn5531 ent-
25 hält (Ankri et al., Journal of Bacteriology (1996) 178:
4412-4419). Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752
wurde mittels Elektroporation (Haynes et al., FEMS Micro-
biology Letters (1989) 61: 329-334) mit dem Plasmid
pCGL0040 transformiert. Klone, bei denen das Transposon

Tn5531 ins Genom integriert war, wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 15 µg/mL Kanamycin enthaltenden LBHIS-Agarplatten identifiziert (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Auf diese Weise wurden 2000 5 Klone erhalten, welche auf verzögertes Wachstum in Anwesenheit von Isoleucyl-isoleucin überprüft wurden. Dazu wurden alle Klone einzeln auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten mit und ohne 3 mM Isoleucyl-isoleucin übertragen. Das Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. beschriebenen 10 Medium CGXII (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), enthielt aber zusätzlich 25 µg/mL Kanamycin und 15 g/L Agar. Die Zusammensetzung des von Keilhauer et al. beschriebenen Mediums ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

15 Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	30 mg/L

Die Agarplatten wurden bei 30°C inkubiert und das Wachstum nach 12, 18 und 24 Stunden untersucht. Es wurde eine Transposonmutante erhalten, die ohne Isoleucyl-isoleucin vergleichbar mit dem Ausgangsstamm *Corynebacterium glutamicum*

5 ATCC14752 wuchs, in Anwesenheit von 3 mM Isoleucyl-isoleucin aber verzögertes Wachstum zeigte. Diese wurde als ATCC14752brnF::Tn5531 bezeichnet.

2. Klonierung und Sequenzierung des Insertionsortes von Tn5531 in ATCC14752brnF::Tn5531

10 Um den stromabwärts des Transposons Tn5531 gelegenen Insertionsort in der in Beispiel 1.1 beschriebenen Mutante zu klonieren, wurde zunächst die chromosomal DNA dieses Mutantenstammes wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben isoliert und 400 ng davon mit 15 der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten. Der vollständige Restriktionsansatz wurde in den ebenfalls mit Eco-RI linearisierten Vektor pUC18 (Norander et al., Gene (1983) 26: 101-106) der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5αmcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1990) 87: 4645-4649) mittels Elektroporation transformiert (Dower et al., Nucleic Acid Research (1988) 16: 6127-6145). Transformanten, bei denen auf dem Vektor 20 pUC18 die Insertionsorte des Transposons Tn5531 kloniert vorlagen, wurden anhand ihrer Carbenicillin- und Kanamycin-resistenz auf 50 µg/mL Carbenicillin und 25 µg/mL Kanamycin enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus drei der Transformanten wurden die Plasmide präpariert und durch Restriktionsanalyse die Größen der klonierten Inserts bestimmt. Die Nukleotidsequenz des Insertionsortes auf einem 25 der Plasmide mit einem ca. 7,2 kb großen Insert wurde nach 30

der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden 1,3 kb des Inserts ausgehend von folgendem Oligonukleotid-Primer sequenziert: 5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'.

Zur Identifizierung des stromaufwärts des Transposons gelegenen Insertionsortes wurde die chromosomal DNA der Mutante mit der Restriktionsendonuklease PstI geschnitten und in 10 den mit PstI linearisierten Vektor pUC18 ligiert. Die weitere Klonierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Nukleotidsequenz des Insertionsortes auf einem der Plasmide mit einem ca. 4,8 kb großen Insert wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden 1,6 kb des Inserts ausgehend von folgendem Oligonukleotid-Primer sequenziert: 5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3'.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurde mit dem Programmepaket Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analysiert und zusammengefügt. Diese Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern von 753 bp, und 324 bp Länge, die als SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 25 4 dargestellt sind. Die entsprechenden Gene wurden als brnF- und brnE-Gen bezeichnet. Die dazugehörigen Genprodukte umfassen 251 und 108 Aminosäuren und sind als SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 5 wiedergegeben.

Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung der brnF-, und brnE-Gene aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Die Gene brnE und brnF des Stammes ATCC13032 wurden in den 5 E. coli Klonierungsvektor pUC18 (Norlander et al., Gene (1983) 26: 101-106, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) kloniert. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurden durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) die Gene aus *Corynebacterium glutamicum* 10 ATCC13032 mittels folgender aus SEQ ID NO 1 abgeleiteter Oligonukleotid-Primer amplifiziert.

brnE, brnF, -forward:

5'-[AGC GCT GTC TGC TTA AGC CTT TTC]-3'

brnE, brnF, -reverse:

15 5'-[GCG CGA TCA ATG GAA TCT AGC TTC]-3'

Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 µM Deoxynukleotid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1 µM des entsprechenden Oligonukleotids, 100 ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 Volumen 20 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten einer hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung (Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 25 94°C für 30 Sekunden, 58°C für 30 Sekunden und 72°C für 2 Minuten.

Das amplifizierte etwa 1,3 kb große Fragment wurde dann im folgenden mit Hilfe des SureClone Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach Angaben des Her-

stellers in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde der E. coli Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1990) 87: 4645-4649) transformiert. Transformanten wurden anhand ihrer Carbenicillinresistenz auf 50 μ g/mL Carbenicillin enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus 8 der Transformanten wurden die Plasmide präpariert und durch Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein des 1,3 kb PCR-Fragments als Insert überprüft. Das so entstandene rekombinante Plasmid wird im folgenden mit pUC18brnEF bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz des 1,3 kb PCR-Fragments in Plasmid pUC18brnEF wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurde das vollständige Insert von pUC18brnEF mit Hilfe folgender Primer der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) sequenziert.

Universalprimer:

20 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Reverseprimer:

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 6 wiedergegeben. Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analysiert.

Abbildungen:

- Figur 1: Karte des das Transposon Tn5531 enthaltenden Plasmids pCGL0040. Das Transposon ist als nicht schraffierter Pfeil gekennzeichnet.

5 Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*

10 • ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryophanum latum*

- SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
- ScaI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces caespitosus*
- SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*

15 • Amp: Ampicillinresistenzgen

- Kan: Kanamycinresistenzgen
- oriBR322: Replikationsregion des Plasmides pBR322

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa-Hüls AG
 Forschungszentrum-Jülich GmbH

10 5 <120> Für den Export verzweigtkettiger Aminosäuren
 kodierende Nukleotidsequenzen, Verfahren
 zu deren Isolierung und ihre Verwendung

15 10 <130> 990128 BT

20 15 <140>
 <141>

25 20 <160> 6

30 25 <170> PatentIn Ver. 2.1

35 30 <210> 1
 <211> 1271
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752

40 35 <220>
 <221> gene
 <222> (101)..(853)
 <223> brnF

45 40 <220>
 <221> gene
 <222> (853)..(1176)
 <223> brnE

50 45 <400> 1
 gcgcgatcaa tggaaatctag cttcatatat tgcacaatag cctagtttag gtgcgcaa 60
 tggcaacaaa actaccggc aattgtgtga tgattgttagt gtgcaaaaaa cgcaagagat 120
 tcattcaagc ctggagggtgt cgccatccaa ggcagccctg gaaccagatg ataaaggta 180
 tcggcgctac gaaatcgcgc aaggctctaa aacctccctt gctgcagggt tgggcatgt 240
 cccgatttgtt attgcgtttg gtctcttgg tattcaatac ggctacgaat ggtggcagc 300
 cccaactgttt tccggcctga ttttcgcggg ctccaccgaa atgctggta tcgcccctgt 360
 tgtgggcccgc ggcgcctgg gcgcgcattgc gctcaccaca ttgctggta acttccgc 420
 cgtattctat gcgttttcat tcccgctgca tgggtcaaa aacccctattt cccgtttcta 480
 ttcggttttc ggcgttatcg acgaaggcta cgcaatcgact gcggccaggc ccgcaggctg 540
 gtcggcgtgg cgacttatct caatgcaat agcgtttcac tcctactggg tattcggcgg 600
 tctcaccggc gtggcgatcg cagagttgtat tcctttgaa attaaggccc tcgagttcgc 660
 cctttgtct ctctttgtca cgctgacttt ggattcctgc cgaacgaaaa agcagatccc 720
 ttctctgtg ctgcagggtt ttagcttcac cattgtctttt gtggtaattt caggtcaggc 780
 cctatttgcg ggcgtgtga ttttcttggg tctgttgacc atccggtaact tctttttggg 840
 aaaggctgtct aaatgacaac tggatctcc tggatctcc ttgttgcgc agtatgtca 900
 gtcattactt ttgcgtccg ggcgttccg ttcttaatcc ttaagccct acgtgaatca 960
 caatttggg gcaaaatggc gatgtggatg ccagcaggaa tccttgccat tttgaccgca 1020
 tcaacgtttc gcagcaatgc gatagatctg aagactctaa ctttgggtct cattgccgtt 1080
 gcgattacag tggggcgca ttttcttggc ggtcgacgca ctttggtagt cgttggcgct 1140
 ggcaccatcg tttttttttgg actggtaat cttttctaaa actgcataaaa taacaaaaat 1200
 ccgcattgccc tcaatttggaa gggatgcgg atttttaag gaacctagaa aaggcttaag 1260
 cagacagcgc t 1271

55 50 <210> 2

<211> 753
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(753)
 <223> brnF

10 <400> 2
 gtg caa aaa acg caa gag att cat tca agc ctg gag gtg tcg cca tcc 48
 Val Gln Lys Thr Gln Glu Ile His Ser Ser Leu Glu Val Ser Pro Ser
 1 5 10 15

15 aag gca gcc ctg gaa cca gat gat aaa ggt tat cgg cgc tac gaa atc 96
 Lys Ala Ala Leu Glu Pro Asp Asp Lys Gly Tyr Arg Arg Tyr Glu Ile
 20 25 30

20 gcg caa ggt cta aaa acc tcc ctt gct gca ggt ttg ggc atg tac ccg 144
 Ala Gln Gly Leu Lys Thr Ser Leu Ala Ala Gly Leu Gly Met Tyr Pro
 35 40 45

25 att ggt att gcg ttt ggt ctc ttg gtt att caa tac ggc tac gaa tgg 192
 Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Leu Val Ile Gln Tyr Gly Tyr Glu Trp
 50 55 60

30 tgg gca gcc cca ctg ttt tcc ggc ctg att ttc gcg ggc tcc acc gaa 240
 Trp Ala Ala Pro Leu Phe Ser Gly Leu Ile Phe Ala Gly Ser Thr Glu
 65 70 75 80

35 atg ctg gtc atc gcc ctc gtt gtg ggc gca gcg ccc ctg ggc gcc atc 288
 Met Leu Val Ile Ala Leu Val Val Gly Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ile
 85 90 95

40 gcg ctc acc aca ttg ctg gtg aac ttc cgc cac gta ttc tat gcg ttt 336
 Ala Leu Thr Thr Leu Leu Val Asn Phe Arg His Val Phe Tyr Ala Phe
 100 105 110

45 tca ttc ccg ctg cat gtg gtc aaa aac ccc att gcc cgt ttc tat tcg 384
 Ser Phe Pro Leu His Val Val Lys Asn Pro Ile Ala Arg Phe Tyr Ser
 115 120 125

50 gtt ttc gcg ctt atc gac gaa gcc tac gca gtc act gcg gcc agg ccc 432
 Val Phe Ala Leu Ile Asp Glu Ala Tyr Ala Val Thr Ala Ala Arg Pro
 130 135 140

55 gca ggc tgg tcg gcg tgg cga ctt atc tca atg caa ata gcg ttt cac 480
 Ala Gly Trp Ser Ala Trp Arg Leu Ile Ser Met Gln Ile Ala Phe His
 145 150 155 160

60 tcc tac tgg gta ttc ggc ggt ctc acc gga gtg gcg atc gca gag ttg 528
 Ser Tyr Trp Val Phe Gly Gly Leu Thr Gly Val Ala Ile Ala Glu Leu
 165 170 175

65 att cct ttt gaa att aag ggc ctc gag ttc gcc ctt tgc tct ctc ttt 576
 Ile Pro Phe Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Ala Leu Cys Ser Leu Phe
 180 185 190

5	gtc acg ctg act ttg gat tcc tgc cga acg aaa aag cag atc cct tct	624
	Val Thr Leu Thr Leu Asp Ser Cys Arg Thr Lys Lys Gln Ile Pro Ser	
	195 200 205	
10	ctg ctg ctc gca ggt ttg agc ttc acc att gct ctt gtg gta att cca	672
	Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ser Phe Thr Ile Ala Leu Val Val Ile Pro	
	210 215 220	
15	ggt cag gcc cta ttt gcg gcg ctg ctg atc ttc ttg ggt ctg ttg acc	720
	Gly Gln Ala Leu Phe Ala Ala Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Thr	
	225 230 235 240	
20	atc cgg tac ttc ttc ttg gga aag gct gct aaa	753
	Ile Arg Tyr Phe Phe Leu Gly Lys Ala Ala Lys	
	245 250	
25	<210> 3	
	<211> 251	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752	
30	<400> 3	
	Val Gln Lys Thr Gln Glu Ile His Ser Ser Leu Glu Val Ser Pro Ser	
	1 5 10 15	
	Lys Ala Ala Leu Glu Pro Asp Asp Lys Gly Tyr Arg Arg Tyr Glu Ile	
	20 25 30	
35	Ala Gln Gly Leu Lys Thr Ser Leu Ala Ala Gly Leu Gly Met Tyr Pro	
	35 40 45	
	Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Leu Val Ile Gln Tyr Gly Tyr Glu Trp	
	50 55 60	
	Trp Ala Ala Pro Leu Phe Ser Gly Leu Ile Phe Ala Gly Ser Thr Glu	
	65 70 75 80	
40	Met Leu Val Ile Ala Leu Val Val Gly Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ile	
	85 90 95	
	Ala Leu Thr Thr Leu Leu Val Asn Phe Arg His Val Phe Tyr Ala Phe	
	100 105 110	
45	Ser Phe Pro Leu His Val Val Lys Asn Pro Ile Ala Arg Phe Tyr Ser	
	115 120 125	
50	Val Phe Ala Leu Ile Asp Glu Ala Tyr Ala Val Thr Ala Ala Arg Pro	
	130 135 140	
	Ala Gly Trp Ser Ala Trp Arg Leu Ile Ser Met Gln Ile Ala Phe His	
	145 150 155 160	
55	Ser Tyr Trp Val Phe Gly Gly Leu Thr Gly Val Ala Ile Ala Glu Leu	
	165 170 175	
	Ile Pro Phe Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Ala Leu Cys Ser Leu Phe	
	180 185 190	

Val	Thr	Leu	Thr	Leu	Asp	Ser	Cys	Arg	Thr	Lys	Lys	Gln	Ile	Pro	Ser		
195							200					205					
5	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Phe	Thr	Ile	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	
	210					215						220					
10	Gly	Gln	Ala	Leu	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Thr	
	225					230					235				240		
Ile	Arg	Tyr	Phe	Phe	Leu	Gly	Lys	Ala	Ala	Lys							
					245					250							
15	<210> 4																
	<211> 324																
	<212> DNA																
20	<213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752																
	<220>																
	<221> CDS																
	<222> (1)...(324)																
25	<223> brnE																
	<400> 4																
	atg	aca	act	gat	ttc	tcc	tgt	att	ctc	ctt	gtt	gtc	gca	gta	tgt	gca	48
	Met	Thr	Thr	Asp	Phe	Ser	Cys	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Val	Val	Cys	Ala
30	1				5				10				15				
	gtc	att	act	ttt	gcg	ctc	cg	g	ccg	ttc	tta	atc	ctt	aag	ccc		96
	Val	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Arg	Ala	Val	Pro	Phe	Leu	Ile	Leu	Lys	Pro	
					20				25				30				
35	ct	cg	ta	ca	tt	gt	gg	aa	at	gc	at	tg	at	cc	ga		144
	Leu	Arg	Glu	Ser	Gln	Phe	Val	Gly	Lys	Met	Ala	Met	Trp	Met	Pro	Ala	
					35				40			45					
40	g	ga	at	ct	cc	at	tt	g	cc	tt	gc	at	cc	aa	gt		192
	Gly	Ile	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Asn	Ala	Ile	
					50				55			60					
45	g	at	ct	tt	gg	ct	tt	gc	at	cc	gg	at	cc	aa	gt		240
	Asp	Leu	Lys	Thr	Leu	Thr	Phe	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Val	
					65				70			75			80		
50	gt	gc	ca	ct	ct	gg	cg	cg	ac	tt	tg	tg	ag	gt	gg	ct	288
	Val	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Gly	Ala	
					85				90			95					
	gg	ac	at	gt	tt	gg	ct	gt	gt	aa	ct	tt	tc				324
	Gly	Thr	Ile	Val	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Phe					
					100				105								
55	<210> 5																
	<211> 108																
	<212> PRT																
	<213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752																

<400> 5
 Met Thr Thr Asp Phe Ser Cys Ile Leu Leu Val Val Ala Val Cys Ala
 1 5 10 15
 5 Val Ile Thr Phe Ala Leu Arg Ala Val Pro Phe Leu Ile Leu Lys Pro
 20 25 30
 10 Leu Arg Glu Ser Gln Phe Val Gly Lys Met Ala Met Trp Met Pro Ala
 35 40 45
 Gly Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ala Ser Thr Phe Arg Ser Asn Ala Ile
 50 55 60
 15 Asp Leu Lys Thr Leu Thr Phe Gly Leu Ile Ala Val Ala Ile Thr Val
 65 70 75 80
 20 Val Ala His Leu Leu Gly Gly Arg Arg Thr Leu Leu Ser Val Gly Ala
 85 90 95
 25 Gly Thr Ile Val Phe Val Gly Leu Val Asn Leu Phe
 100 105
 30
 <210> 6
 <211> 1271
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 35
 <220>
 <221> gene
 <222> (101)..(853)
 <223> brnF
 40
 <220>
 <221> gene
 <222> (853)..(1176)
 <223> brnE
 45
 <400> 6
 gcgcgatcaa tggaaatctag cttcatatat tgcacaatag cctagtttag gtgcgcaaac 60
 tggcaacaaa actaccggc aattgtgtga tgattttagt gtgcaaaaaaaaa cgcaagagat 120
 tcattcaagc ctggaggtgt cccatccaa ggcagccctg gaaccagatg ataaaaggta 180
 tcggcgctac gaaatcgccg aaggctaaa aacccctt gctgcagggt tggcatgtt 240
 cccgatttgtt attgcgtttg gtcttttgtt tattcaatac ggctacgaat ggtgggcagc 300
 cccactgttt tccggcctga ttttgcggg ctccaccgaa atgctggtca tcgcctctgt 360
 tgtgggcgca gcccctgg gcgcattcgc gtcaccacca ttgctggtga acttccgcca 420
 cgtattctat gcgtttcat tccgcgtca tgggtcaaa aacccatgg cccgtttcta 480
 45 ttcggtttc ggcgttatcg acgaaggccta cgcagtcact gcggccaggc ccgcaggctg 540
 gtcggcgtgg cgacttatct caatgcaaat agcgtttcac tcctactggg tattcggcgg 600
 ttcacccgga gtggcgtatcg cagagttgat tcctttgaa attaagggcc tcgagttcgc 660
 cctttgtct ctctttgtca cgctgacttt ggattctgc cgaacgaaaa agcagatccc 720
 50 ttctctgtg ctcgcagggt tgagttcac cattgtctt gtggtaattc caggtcaggc 780
 cctatttgcg ggcgtgtca tcttcttggg tctgttgacc atccgtact tcttcttggg 840
 aaaggctgct aaatgacaac tgatttctcc tggatctcc ttgtgtcgc agtatgtca 900
 gtcattactt ttgcgtccg ggcgggtccg ttcttaatcc ttaagccct acgtgaatca 960
 caatttgtgg gcaaaatggc gatgtggatg ccagcaggaa tccttgccat tttgaccgca 1020
 tcaacgtttc gcagcaatgc gatagatctg aagactctaa ctttggtct cattggcgtt 1080

gcgattacag tggtggcgca tcttcttggc ggtcgacgca cttgttgag cgttggcgct 1140
ggcaccatcg tttttgttgg actggtaat cttttctaaa actgcataaa taacaaaaat 1200
ccgcatgccc tcaatttggaa gggatgcgg attttttaag gaaccttagaa aaggcttaag 1260
cagacagcgc t 1271

Patentansprüche

1. Isolierte Polynukleotide, enthaltend mindestens eine der Polynukleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das mindestens eine Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit mindestens einer Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) oder c), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenzen von a), b), oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) eine der Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 6, oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

5 5. Aminosäuresequenz des Proteins, abgeleitet aus den Nukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dargestellt in der SEQ-ID-No. 2 und der SEQ-ID-No. 4.

10 6. Coryneform Mikroorganismen, insbesondere der Gattung Corynebacterium, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 2 oder 5.

7. Verfahren zur Herstellung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren durch Fermentation coryneformer Bakterien,

15 da durch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man das brnE- und/oder brnF-Gen oder dafür codierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7,

20 da durch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7,

25 da durch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 10,

30 da durch gekennzeichnet, daß man einen mit einem oder mehreren Plasmidvektoren transformierten Stamm einsetzt, und der die Plasmidvek-

tor(en) die für das brnE- und/oder brnF-Gen codierende Nukleotidsequenz trägt (tragen).

11. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 10,

5 durch gekennzeichnet, daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Isoleucin, L-Valin oder L-Leucin herstellen.

12. Verfahren zur Herstellung von verzweigtkettigen L-Aminosäuren,

10 durch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, in denen zumindest das brnE- und/oder brnF-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird, ggf. in Kombination mit weiteren Genen,
- b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium
- 20 oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

13. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

25 durch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.

14. Verfahren zur Isolierung des brnE- bzw. brnF-Gen, durch gekennzeichnet, daß man als Indikatorstämme in diesem/diesen Gen(en) defekte Mutanten, vorzugsweise coryneformer Bakterien gewinnt, die auf einem ein Isoleucin und/oder Leucin und/oder Valin haltiges Oligopeptid enthaltenden Nährmedium nicht oder nur gering wachsen und

- a) das brnE- bzw. brnF-Gen nach dem Anlegen einer Genbank identifiziert und isoliert, oder
- b) im Fall der Transposon-Mutagenese auf das bevorzugt eine Antibiotikaresistenz enthaltende Transposon selektiert und so die gewünschten Gene erhält.

5

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft isolierte Polynukleotide, enthaltend mindestens eine der Polynukleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe

5 a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das mindestens eine Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit mindestens einer Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 oder 5,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) oder c), und

15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenzen von a), b) oder c),

wobei die Polypeptide die biologische Aktivität der Enzyme aufweisen, für das das brnE bzw. bernF-Gen codiert, und
20 Verfahren zur fermentativen Herstellung von verzweigtketigen L-Aminosäuren unter Verstärkung der genannten Gene.

Figure 1:

